



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO



LAÉRCIA KARLA DIEGA PAIVA FERREIRA

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE PRÉ-CLÍNICA
AGUDA E GENOTOXICIDADE DO ALCALOIDE
SINTÉTICO MHTP [1-(3- METOXI- 4-
HIDROXIFENIL)-7-METOXI-1,2,3,4,-
TETRAHIDROISOQUINOLINA]**

JOÃO PESSOA – PARAÍBA

2014

LAÉRCIA KARLA DIEGA PAIVA FERREIRA

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE PRÉ-CLÍNICA
AGUDA E GENOTOXICIDADE DO ALCALOIDE
SINTÉTICO MHTP [1-(3- METOXI- 4-
HIDROXIFENIL)-7-METOXI-1,2,3,4,-
TETRAHIDROISOQUINOLINA]**

Monografia apresentada à Coordenação do
Curso de Farmácia do Centro de Ciências da
Saúde, da Universidade Federal da Paraíba,
como requisito parcial para obtenção do título
de Bacharel em Farmácia.

Prof^a. Dr^a. Marianna Vieira Sobral
ORIENTADORA

JOÃO PESSOA – PARAÍBA
2014

F383aFerreira, Laércia Karla Diega Paiva.

Avaliação da toxicidade pré-clínica aguda e genotoxicidade do alcaloide sintético MHTP [1-(3- metoxi- 4-hidroxifenil)-7-metoxi—1, 2, 3, 4,-tetrahidroisoquinolina] / Laércia Karla Diega Paiva Ferreira. - João Pessoa: [s.n.], 2014. 52f. : il.

Orientadora:Marianna Vieira Sobral.

Monografia (Graduação) – UFPB/CCS.

1. Toxicidade aguda. 2. Genotoxicidade. 3. MHTP. 4. Alcaloide sintético.

LAÉRCIA KARLA DIEGA PAIVA FERREIRA

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE PRÉ-CLÍNICA E
GENOTOXICIDADE DO ALCALOIDE SINTÉTICO MHTP [1-
(3- METOXI- 4-HIDROXIFENIL)-7-METOXI-1,2,3,4,-
TETRAHIDROISOQUINOLINA]**

Aprovado em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Marianna Vieira Sobral (**Orientadora**)
(Departamento de Ciências Farmacêuticas – UFPB)

Prof^a. Dr^a. Márcia Regina Piuvezam
(Departamento de Fisiologia e Patologia – UFPB)

Prof. Dr^a. Giciane Carvalho Vieira
(Departamento de Morfologia – UFPB)

“E, tudo o que pedirdes em oração, crendo, o recebereis.”

Mateus 21:22

Dedico este trabalho a Deus e a minha família, meus pais maravilhosos Clélia Paiva da Veiga e Luiz Carlos de Souza Ferreira, minha irmã Larissa Adilis Maria Paiva Ferreira e minha avó Maria Alves de Souza Ferreira, por serem à base de tudo em minha vida e, principalmente, por me ensinarem que o meu socorro e abrigo estão no único Senhor: Jesus!

AGRADECIMENTOS

Deus, meu sentimento para contigo é redenção. Quando me rendi aos teus pés, me mostrasse o quão grande é teu amor para comigo, mesmo sem eu merecer, me deste o melhor presente de todos: minha salvação, como na tua palavra fala “porque os meus pensamentos não são os vossos pensamentos, nem os vossos caminhos, os meus caminhos, diz o Senhor (Is 55:8)”, te agradeço por tua proteção e cuidado para com minha vida durante esse curso e toda minha vida, por cada pessoa que colocaste nela, oportunidades a mim concedidas, porque todas as coisas cooperam para o bem daqueles que te amam.

Aos meus pais, Luiz Carlos de Souza Ferreira e Clélia Paiva da Veiga, pela educação, amor e carinho, todos os conselhos, todo esforço em minha criação. Vocês são meus exemplos de vida e principalmente de pais, EU AMO MUITO VOCÊS. **A minha pequena grande irmã, Larissa Adilis Maria Paiva Ferreira**, que além de irmã de sangue é minha irmã em Cristo, obrigada por sempre estar do meu lado e ser meu porto seguro, você é uma benção de Deus em nossa família. **A minha avó sentimental, Maria Alves de Souza Ferreira**, “veia te amo demais, chantagista”, obrigada por estar nos bastidores de minha família e também ser a matriarca, tenho muito orgulho da senhora. **Aos meus familiares**, tio(a)s, primo(a)s, que não são poucos e não quero ser injusta com ninguém, obrigada pelos momentos de união, de alegrias, de encorajamento e amor de família compartilhados.

Aos meus amigos extra graduação, meus tesouros, obrigado por me amarem como sou, por contribuírem por meu crescimento e por não desistirem de mim mesmo tão ausente, mas algo que aprendi é que o tempo não apaga um relacionamento verdadeiro, ele amadurece o sentimento e nos faz aproveitar ao máximo os momentos juntos de reencontros. Obrigada por fazerem parte de minha história, serem minhas válvulas de escape quando me desesperava com o fim de período, notas baixas; animavam-me com minhas conquistas, e também perdão por todos os momentos que precisei escolher estudar ao invés da companhia de vocês.

Aos amigos da graduação, agradeço a todos que fazem parte da minha turma, FARMAIORAIS 2009.2, os quais fizeram parte do meu processo de amadurecimento pessoal; sabendo que na vida não escolhemos com quem trabalhar, mas trabalhamos na forma de conviver com as pessoas ao nosso redor. Segundo a palavra inspirada por Deus, que fala: “suportando-vos uns aos outros e perdoando-vos uns aos outros, se algum tiver queixa contra outro, assim como Cristo vos perdoou, assim fazei vós também (Cl 3: 13)”, tive o prazer de vivenciar essas palavras, e como é gratificante saber que podemos conviver com nossas diferenças, onde o respeito é o dono do jogo. Por compartilhar os melhores e mais ricos momentos da minha vida. Tenho plena certeza que amizades aqui formadas estarão sempre em meu coração.

Aos Professores da graduação, obrigado por confiar a nós todo o conhecimento que possuem por nos ensinar ciência, estimular nosso melhor e acreditar em nosso potencial, sempre mostrando o orgulho de ser farmacêutico e professor. Sobre tudo, meus sinceros agradecimentos as **Professoras Doutoras Márcia Regina Piuvezam e Giciane Carvalho Vieira**, que me iniciaram na pesquisa, uma me ensinou a amar Imunologia e a outra, à Asma, rsrsrsr, me ensinaram a ter e conviver com a responsabilidade profissional. Obrigada pela força e apoio incondicional nessa caminhada.

Aos que constroem o Laboratório de Imunofarmacologia, um local que me fez aprender ciência, onde fiz grandes amigos e aprendi a admirar cada um. Dentre eles, **Fagner, Adriano, Allysson, Talissa, Ana Luisa, Talita, Rachel, Raquel, Guilherme, Danilo, Éssia, Larissa, Prof. Giciane** e os que já “voaram para galgar outros ares”, mas que admiro demais, como **Hermann, Anne, Renatinha, Jacqueline e Juliana**. Porque a melhor lição que tenho desse ambiente é que a união faz artigos, resumos e enfim, ciência nunca é individual, sempre é coletiva.

A minha orientadora, a Professora Doutora Marianna Vieira Sobral, por gentilmente ter me aceito nesta etapa fundamental do meu curso, obrigada por sua paciência, atenção e orientação, digna de toda minha admiração. Muito obrigada professora.

A todos que fazem parte do LABETOX (Laboratório de Ensaios Toxicológicos) por me receberem extremamente bem, e em especial a mestranda **Tatianne Mota Batista**, obrigada por ter sido minha mão direita e esquerda. Você foi meu anjo nesse TCC.

A minha orientadora de iniciação científica, a Professora Doutora Márcia Regina Piuvezam, um exemplo de profissional. Agradeço imensamente a oportunidade de participar de seu grupo de pesquisa, desde o 2º período, nunca me esquecerei do dia 19 de março de 2010, só tenho que agradecer por toda orientação, pelo seu jeito de orientar, por ser meu espelho, e também pela confiança depositada em mim, a orientação de fazer o mestrado, tenho muito orgulho de ser sua orientanda, MUITO OBRIGADA.

A professora doutora Giciane Carvalho Vieira, professora, mas também companheira de bancada, exemplo de organização e concentração científica, responsável por me apresentar minha linha de pesquisa e, mais ainda, me ensinar cada passo, obrigada por ser sua aluna adotiva. Agradeço muito a Deus por ter você em minha vida em um momento que estava quase desistindo da pesquisa.

Aos professores membros da Banca Examinadora **Márcia Regina Piuvezam e Giciane Carvalho Vieira**, pela disponibilidade em contribuir para o enriquecimento desse trabalho.

Aos funcionários da Universidade Federal da Paraíba, que estiveram presentes durante toda a minha graduação, participando direta ou indiretamente para realização desse sonho. **Aos técnicos de laboratório, aos funcionários do Biotério Dr. Thomas George**, por tornar possível a execução de nossos projetos.

A Universidade Federal da Paraíba pela estrutura física, recursos humanos e o estímulo à pesquisa que proporcionaram minha formação.

RESUMO

O alcaloide sintético 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolina, codificado como MHTP, é um alcaloide tetrahydroisoquinolínico e sua síntese obteve 93,45% de rendimento. O composto apresentou efeito vasorrelaxante e anti-inflamatório no modelo de peritonite. Devido as suas promissoras atividades farmacológicas ea ausencia de estudos toxicologicos, o objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade pré-clínica aguda bem como a genotoxicidade deste alcaloide. A toxicidade aguda do MHTP na dose de 1.000 mg/Kg foi analisada, utilizando-se os parâmetros: consumo de água e ração, peso corporal, letalidade e índices de peso dos principais órgãos, bem como parâmetros bioquímicos e hematológicos. A genotoxicidade do MHTP também na dose de 1000 mg/kg foi analisada pelo teste do micronúcleo em sangue periférico de camundongos. Durante o ensaio de toxicidade aguda, não ocorreu morte nem alterações comportamentais nos animais tratados com MHTP. Nenhuma diferença significativa foi observada nos índices de peso corporal de coração, fígado, rins, baço e timo após tratamento agudo com MHTP. Ainda, não foi observado alteração nos parametros hematológicos avaliados, no entanto o grupo de camundongos fêmeas, tratados com MHTP, apresentou um aumento significativo nos parâmetros bioquímicos: ALT, proteínas totais, triglicerídeos e colesterol total em comparação com o controle, já o grupo de machos tratados com MHTP apresentou um aumento de albumina quando comparado ao grupo controle. O MHTP não apresentou genotoxicidade no ensaio de micronúcleo em sangue periférico. Portanto pode-se concluir que o alcaloide MHTP possui baixa toxicidade nos modelos experimentais avaliados.

Palavras chaves: *Toxicidade aguda; Genotoxicidade; MHTP; Alcaloide sintético.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Núcleos isoquinolínico, tetrahydroisoquinolínico e tetrahydroisoquinolínico-1 substituído.....	18
Figura 2: Estrutura química das Criptostilinas I, II, III.....	18
Figura 3: Estrutura química do MHTP [1-(3- metoxi- 4-hidroxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4,- tetrahydroisoquinolina].....	19
Figura 4: Esquema de Eritrócitos micronucleados.....	22

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Tabela das Alterações do SNC (Almeida, 1999).....	28
Tabela 2: Consumo de água e ração, avaliação ponderal e porcentagem de ganho de peso dos animais dos diferentes grupos experimentais.....	32
Tabela 3: Efeitos do MHTP sobre o índice dos órgãos dos camundongos dos diferentes grupos experimentais.....	34
Tabela 4: Efeito do MHTP nos parâmetros bioquímicos de sangue periférico de camundongos.....	36
Tabela 5: Efeito do MHTP nos parâmetros hematológicos de sangue periférico de camundongos.....	42
Tabela 6: Frequência de eritrócitos micronucleados em sangue periférico de camundongos.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT: Alanina aminotransferase

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância sanitária

AST: Aspartatoaminotransferase

CBIOTEC: Centro de Biotecnologia

CHCM: Concentração Hemoglobínica Corpuscular Média

DL50: Dose letal de 50

e.p.m: erro padrão da média

GAMA – GT: Gama glutamiltransferase

HCM: Hemoglobina Corpuscular Média

LD: Lactato desidrogenase

MHTP: [1 - (3 – metoxi – 4 - hidroxifenil) – 7 – metoxi - 1, 2, 3, 4, - tetrahydroisoquinolina]

MN: Micronúcleo

NPN: Compostos nitrogenados não proteicos

OECD: *Organisation for Economic Co-operation and Development*

SNA: Sistema Nervoso Autônomo

SNC: Sistema Nervoso Central

UFPB: Universidade Federal da Paraíba

VCM: Volume Corpuscular Médio

V.O.: Via oral

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Extração de produtos naturais x síntese química	15
1.2 Alcaloides	16
1.3 MHTP [1 - (3 – metoxi – 4 - hidroxifenil) – 7 – metoxi- 1, 2, 3, 4,- tetrahidroisoquinolina]	18
1.4 Estudo de toxicidade pré-clínica aguda e genotoxicade	20
2. OBJETIVOS	24
2.1 Objetivo geral	24
2.2 Objetivos específicos	24
3. MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1 Material	26
3.1.1 Animais	26
3.1.2 Preparo da solução do alcaloide MHTP	26
3.2 Métodos	27
3.2.1 Avaliação da toxicidade pré clínica aguda	27
3.2.1.1 Avaliação da evolução ponderal e do consumo de água e ração	29
3.2.1.2 Avaliação dos índices de peso dos órgãos	29
3.2.1.3 Avaliação dos parâmetros bioquímicos e hematológicos	29
3.2.2 Avaliação da genotoxicidade do MHTP	30
3.2.3 Análise estatística	30
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1 Avaliação da toxicidade pré-clínica aguda do MHTP	32
4.1.1 Avaliação comportamental, evolução ponderal e consumo de água e ração	31
4.1.2 Avaliação do índice de peso dos órgãos	34
4.1.3 Avaliação dos parâmetros bioquímicos	35
4.1.4 Avaliação dos parâmetros hematológicos	41
4.2 Avaliação da genotoxicidade	43
4.2.1 Avaliação da frequência de eritrócitos micronucleados em sangue periférico	43
5 CONCLUSÕES	46
REFERÊNCIAS	48

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A química de produtos naturais e a química orgânica sintética têm sido a força motriz para a pesquisa e consequente descoberta de medicamentos (IWAJO OJIMA, 2008). Grande parte dos novos medicamentos tem sido gerada a partir de compostos derivados de produtos naturais e de seus metabólitos secundários (MOUHSENLAHLOU, 2013), uma vez que estes vêm demonstrando atividades biológicas, que podem auxiliar no tratamento de câncer, infecções microbianas, inflamação, hipercolesterolemia, e rejeição de tecidos em transplantes de órgãos; podendo atuar como ferramentas úteis para a pesquisa e desenvolvimento de novos medicamentos pela química orgânica sintética (IWAJO OJIMA, 2007).

1.1 Extração de produtos naturais x síntese química

Os produtos naturais representam uma das principais fontes de agentes terapêuticos utilizados no combate de doenças infecciosas (tanto bacterianas como fúngicas), câncer, distúrbios lipídicos e atuam na imunomodulação de processos inflamatórios. No entanto, a complexidade estrutural e biossintética tendem a limitar as possibilidades de fazer modificações químicas com o intuito de otimizar o seu uso terapêutico. Além disso, a obtenção de uma fonte renovável de compostos ativos a partir de fontes biológicas pode ser problemática (CLARDY, 2004).

As dificuldades para obtenção e isolamento de quantidades significativas de metabólitos secundários e, em especial alcaloides, necessários para estudos farmacológico e toxicológico, indispensáveis para os ensaios *in vitro* e principalmente *in vivo*, comprometem a preservação das espécies vegetais. Principalmente devido à produção de pequenas quantidades de alcaloides e metabólitos secundários em geral, e estes serem de difícil purificação, necessitam de uma demanda maior no extrativismo vegetal, resultando em um método pouco atraente do ponto de vista econômico, fazendo com que suas preparações sintéticas sejam de grande interesse (MARK, 2004).

Estudos que visam o aprimoramento de métodos sintéticos para obtenção desses compostos, além de viabilizar a produção em larga escala, oferecem a flexibilidade necessária à preparação de análogos que viabilizam não só os estudos farmacológicos *in vivo* como oferecem a oportunidade de estudos da relação estrutura-atividade tornando-os, em alguns casos, viáveis para o desenvolvimento de medicamentos (CORDEIRO, 2012).

1.2 Alcaloides

Os alcaloides (*alcalino-like*) são metabólitos secundários produzidos por uma variedade de organismos vivos, como: bactérias, fungos, algas marinhas, microrganismos e plantas. São amplamente distribuídos na natureza, com uma gama de estruturas, rotas de biossíntese e importantes atividades farmacológicas já descritas na literatura (BHADRA, 2011), apresentando tanto atividade terapêutica quanto tóxica (ROBERTS, 1998).

A forma cristalina bem definida que se une com ácidos para formar sais, não é uma característica geral para esses metabólitos, uma vez que, por formar um grande grupo de substâncias com grandes diferenças estruturais entre elas, torna difícil sua definição base, por não ter uma fronteira precisa entre o alcaloide e aminas naturais complexas (WILLIAM, 2009).

Atualmente, a definição mais aceita para esta classe de compostos é de Peletier, reconhecida no ano de 1983, que propõe que “alcaloide seria uma substância orgânica, de origem natural, cíclica, contendo um nitrogênio em estado de oxidação negativo e cuja distribuição é limitada entre os organismos vivos” (GISELE, 2011).

Devido a sua capacidade de exercer atividades farmacológicas, particularmente em mamíferos, os alcaloides têm sido estudados há mais de 4 mil anos na medicina, todavia, apenas no século XIX foram isolados alguns exemplares com atividade terapêutica e, estima-se que são conhecidos cerca de 10.000 alcaloides, tendo participação na composição química de medicamentos

comercializados mundialmente e sendo objeto de estudos de novos candidatos a fármacos (WILLIAM, 2009).

A morfina, derivada do ópio, extraído da *Papaversomniferum*, é o alcaloide pioneiro e mais famoso na literatura, teve sua ação medicinal estudada e suas propriedades anestésica e narcótica comprovadas. Outros estudos com alcaloides isolados demonstraram suas propriedades anti-hipertensiva, anti-arritmica, anticancerígena, antibiótica, sendo esses apenas alguns exemplos que ilustram a importância do grupo (ROBERTS, 1998).

Além da sua atuação como produto natural, diversos alcaloides servem como modelo para a síntese química de moléculas análogas com propriedades melhoradas. Como exemplo, os alcaloides hiosciamina e escopolamina são modelos para a síntese de agentes capazes de reduzir a atividade do sistema nervoso parassimpático; a tubocurarina para relaxantes do músculo estriado esquelético; a morfina para produção de anestésicos e a codeína para agentes antitussígenos (ROBERTS, 1998).

As variedades em sua origem botânica, bioquímica, na estrutura química e na sua ação farmacológica, dão origem a diversas formas de classificar os alcaloides. Uma classificação didática comum é baseada na origem dos alcaloides em relação aos aminoácidos. São consideradas duas categorias gerais: a) Alcaloides não-heterocíclicos ou atípicos, também chamados de 'proto-alcaloides' ou aminas biológicas; b) Alcaloides heterocíclicos ou típicos, subdivididos de acordo com a sua estrutura em anel (WILLIAM, 2009).

Os alcaloides típicos são derivados de fontes vegetais, possuem caráter básico, um ou mais átomos de nitrogênio (normalmente em um anel heterocíclico), demonstrando, geralmente, uma ação fisiológica sobre o homem ou outros animais. Exemplos de alcaloides típicos são os alcaloides isoquinolínicos, comumente encontrados em numerosos produtos naturais, estruturalmente diversos que exibem uma vasta gama de atividades biológicas e farmacológicas (AWUAH, 2010), dentre elas, atividade hipotensora, como a berberina (LI, 2011), discretamina (SILVA, 2009), e CPU-23 (DONG, 1992), e anti-inflamatória, como a norisoboldina (LUO, 2010) e YS-51 (CHAEA, 2007).

1.3 MHTP [1 - (3 - metoxi - 4 - hidroxifenil) - 7 - metoxi - 1, 2, 3, 4, - tetrahydroisoquinolina]

A ocorrência do núcleo isoquinolínico nos alcaloides e outros produtos naturais biologicamente ativos e a impressionante versatilidade farmacológica destes compostos, como agentes anti-infecciosos, anti-helmínticos, anti-hipertensivos, analgésicos, anti-inflamatórios e bloqueadores musculares dentre outras aplicações (SHAMMA,1972) têm despertado interesse nos farmacologistas experimentais. Em particular, as tetrahydroisoquinolinas C1- substituídas (Figura 1), embora sendo estruturalmente simples, são de grande interesse, não apenas como alcaloides em si, mas também como intermediários úteis na síntese de alcaloides mais complexos (AMAT, 2010).

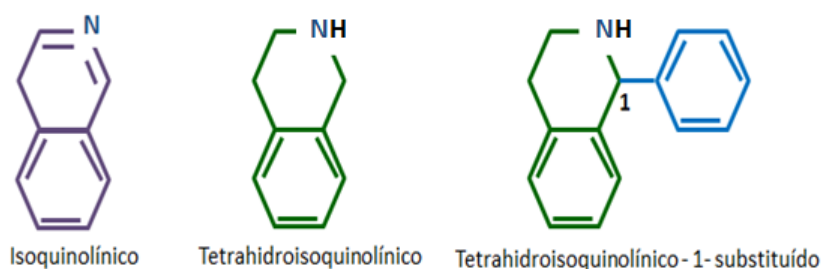


Figura 1: Núcleos isoquinolínico, tetrahydroisoquinolínico e tetrahydroisoquinolínico-1 substituído.

Os alcaloides tetrahydroisoquinolínicos criptostilina I, criptostilina II e criptostilina III foram os primeiros alcaloides a serem isolados da natureza a partir da planta *Cryptostylis fulva*, com o grupo fenil em C-1 (carbono-1) (GRUNDON, 1976).

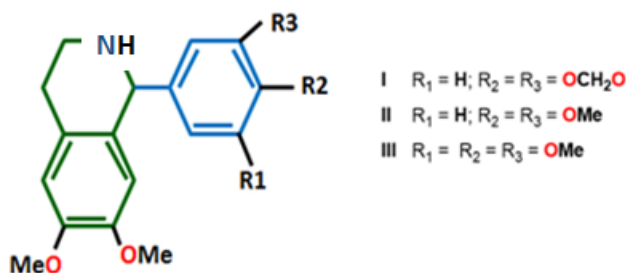


Figura 2: Estrutura química das Criptostilinas I, II, III.

A síntese inédita do alcaloide tetrahydroisoquinólico, codificado como MHTP [1-(3- metoxi- 4-hidroxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4,- tetrahydroisoquinolina] (Figura 3), aplicando a consagrada reação de *Pictet-Spengler*, teve rendimento de 93,45%, propiciando o estudo inicial deste alcaloide no qual apresentou atividade anti-inflamatória aguda, utilizando o modelo de inflamação peritoneal induzida por zimosan (em camundongos), o qual permite analisar a migração celular no sítio inflamatório, bem como a produção e liberação de mediadores da inflamação no fluido peritoneal. Esse ensaio mostrou que o pré-tratamento com MHTP (2,5 e 5mg/kg), por via oral, diminuiu a migração de leucócitos para o local da inflamação assim como a quantidade de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 e IL-6), características da fase aguda, sem alterar a citocina anti-inflamatória IL-10; apresentou também atividade hipotensora quando administrado por via endovenosa em ratos normotensos, uma vez que, induziu um efeito vasorrelaxante, mediado pela via de óxido nítrico e da enzima guanililciclase, assim como pelos produtos das ciclooxigenase (CORDEIRO, 2012). O MHTP é análogo estrutural da criptostilina II, que possui atividade anti-inflamatória já descrita na literatura (AWUAH, 2010).

No entanto, é necessário se fazer um estudo de sua toxicidade pré-clínica aguda, para avaliar o seu perfil de toxicidade e sua possível aplicabilidade farmacológica, subsidiando a realização de ensaios clínicos e posterior produção de um medicamento.

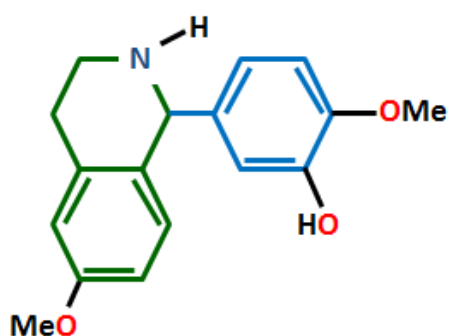


Figura 3: Estrutura química do MHTP [1-(3- metoxi- 4-hidroxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4,- tetrahydroisoquinolina].

1.4 Estudo de toxicidade pré-clínica aguda e genotoxicidade

O estudo da avaliação do potencial tóxico de substâncias naturais ou sintéticas que são utilizadas na formulação de medicamentos é realizado através de pesquisas científicas pré-clínicas, utilizando testes toxicológicos, tanto *in vitro* como *in vivo*, que subsidiam a realização de ensaios clínicos e posterior produção de um medicamento, assegurando à população uma terapia segura e estabelecendo sua segurança, eficácia e garantia de qualidade das preparações medicamentosas (LAPA, 2003; RATES, 2001).

O estudo toxicológico pré-clínico de um produto é uma etapa inicial importante para seu uso seguro na saúde humana e ambiental, pois visa à caracterização dos efeitos tóxicos produzidos a partir de sua administração. Além disso, os estudos toxicológicos pré-clínicos têm o propósito de buscar informações para os pesquisadores clínicos sobre as doses capazes de provocar efeitos tóxicos em animais de laboratório (ALMEIDA, 2006).

A toxicidade é avaliada com o objetivo de determinar o potencial de novas substâncias e produtos que podem causar danos à saúde humana. Testes que avaliam a toxicidade sistêmica aguda são utilizados para classificar e, apropriadamente, rotular substâncias de acordo com o seu potencial de letalidade ou toxicidade como estabelecido pela legislação. Além da letalidade, outros parâmetros são investigados para identificar o potencial tóxico em órgãos específicos, a toxicocinética e a relação-dose resposta. Outras informações podem ainda ser obtidas numa avaliação de toxicidade aguda como: indicativos sobre o mecanismo de ação tóxica; diagnóstico e tratamento das reações tóxicas; estabelecimento das doses para estudos adicionais de toxicidade; informações para a comparação de toxicidade entre substâncias de mesma classe; informações sobre quais seriam as consequências de exposições acidentais no trabalho ou no ambiente doméstico; além de ser um padrão para a avaliação de testes alternativos ao uso de animais experimentais (VALADARES, 2006).

Vários ensaios devem ser realizados durante a investigação de uma determinada amostra. Inicialmente, faz-se o ensaio de toxicidade aguda que avalia a toxicidade após exposição a uma única dose ou dose fracionada administrada no período de 24 horas, seguido de observação dos animais por 14 dias após administração (BRASIL, 2013e). Posteriormente deve se realizado o ensaio de doses repetidas, que avalia a toxicidade após a exposição a doses diárias repetidas; e estudo de genotoxicidade, sendo este efetuado quando se tem indicação de uso contínuo ou prolongado do medicamento em humanos (*Guia para a condução de Estudos não clínicos de Segurança necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos. Brasília, 31 de janeiro de 2013*).

O ensaio toxicológico agudo permite conhecer o índice de letalidade, a forma de morte produzida pelo excesso do produto em teste e os órgãos alvos, além das alterações comportamentais e os sinais que precedem a morte; são obrigatórios para todo tipo de material em teste, independente do tempo de uso proposto para a espécie humana, pois evidenciam o risco de intoxicações agudas, inadvertidas ou não, e a forma de preveni-las (LARINI, 1999).

Dentre os métodos para investigação de genotoxicidade *in vivo*, o teste do micronúcleo em camundongos é amplamente empregado e aceito pelas agências reguladoras e comunidade científica (MATEUCA, 2006). O teste do micronúcleo vem sendo utilizado, a princípio, como método para avaliar a habilidade da substância teste de induzir danos cromossômicos estruturais ou numéricos, ambos frequentemente associados com o aparecimento e/ou progressão de tumores (HAYASHI, 2007).

O teste do Micronúcleo (MN) baseia-se na observação de células que sofrem quebra de cromátides, ou alterações na distribuição de suas cromátides, devido à ação de agentes genotóxicos. Durante a anáfase (fase da divisão celular em que há a segregação dos cromossomos), os fragmentos provenientes das quebras ou cromossomos inteiros, não acompanham a migração para os pólos da célula. Na fase seguinte, a telófase, responsável pela descondesação dos cromossomos e formação de um novo invólucro nuclear em torno de cada conjunto de cromossomos, tais fragmentos cromatídicos não são incluídos nos núcleos das células filhas, formando um único ou múltiplos micronúcleos no citoplasma dessas células (COSTA E SILVA, 2010). A formação do MN está demonstrada na figura 4, a seguir:

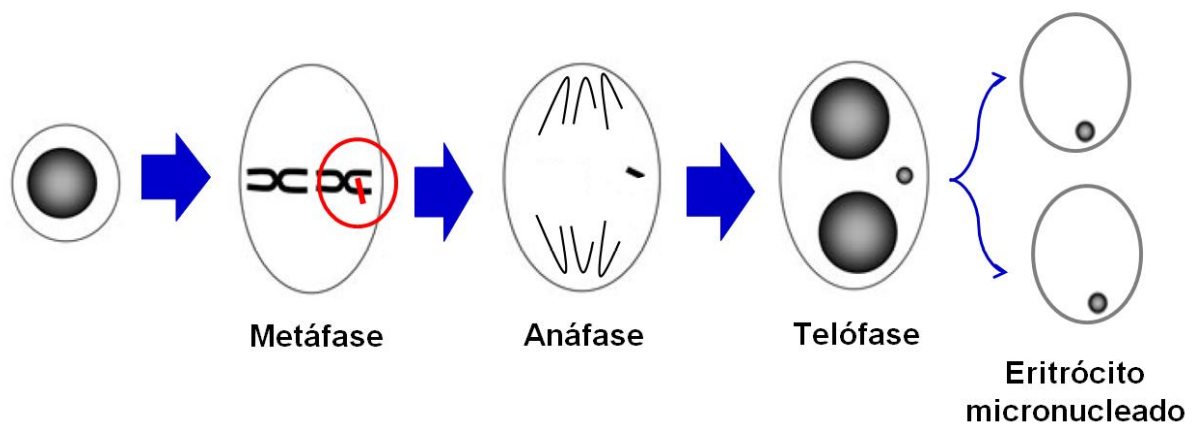


Figura 4: Esquema de Eritrócitos micronucleados.

A formação do MN representa tanto uma alteração cromossômica estrutural como uma alteração numérica (SALVADORI, 2003), uma vez que o aumento da frequência de MN é indicativo de aumento das taxas de mutações, representando o aumento da instabilidade genética nas células (CARVALHO, 2002).

Os eventos que levam à formação do MN podem ser induzidos pelo estresse oxidativo, exposição a agentes clastogênicos (interferem diretamente na quebra das cromátides) ou aneugênicos (interferem na segregação dos cromossomos), defeitos genéticos nos pontos de checagem do ciclo celular e/ou nos genes de reparo do DNA e também pela deficiência de nutrientes requeridos como co-fatores no metabolismo do DNA e na maquinaria da segregação cromossômica (BONASSI, 2007). Assim, quando um produto em teste aumenta a frequência de eritrócitos micronucleados, há a indicação de que ele interfere na divisão nuclear dos eritroblastos da medula, quebrando cromossomos ou interferindo no fuso, levando ao aparecimento de fragmentos de cromatina ou cromossomos inteiros, que não se incorporaram ao núcleo das células-filhas, chamados micronúcleos (COSTA E SILVA, 2010).

Sob condições experimentais apropriadas, os resultados negativos suportam a conclusão de que a substância teste não é clastogênica nem aneugênica. Mesmo sabendo que a toxicidade genética não é indicativa de carcinogenicidade, esta é, frequentemente, associada ao aparecimento do câncer, visto que, existe uma correlação positiva entre o aumento da frequência de micronúcleos e o aparecimento de tumores em roedores e no homem (DE OLIVEIRA AZEVEDO, 2003; REZENDE, 2006).

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a toxicidade pré-clínica aguda e genotoxicidade do alcaloide MHTP na dose de 1000 mg/kg em camundongos.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar as alterações comportamentais após o tratamento;
- ✓ Avaliar o consumo de água e ração;
- ✓ Avaliar o peso corporal;
- ✓ Avaliar os parâmetros bioquímicos e hematológicos;
- ✓ Avaliar a frequência de eritrocitos micronucleados em sangue periférico.

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Animais

Foram utilizados camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*) pesando entre 28 e 32 g, com faixa etária próxima de 60 dias (jovens adultos), obtidos do biotério Prof. Thomas George (ANVISA/CBiotec/UFPB). Os animais foram agrupados em gaiolas de polietileno, mantidos sob condições controladas de temperatura de 21 ± 1 °C sob o ciclo dia/noite natural (12h claro e 12h escuro), com água e alimento (tipo *pellets* de ração da marca Purina®) *ad libitum* durante o experimento e sem uso de qualquer medicação. Antes da realização de qualquer protocolo experimental, os animais foram colocados no ambiente de trabalho por, pelo menos, 30 minutos de antecedência à execução do experimento.

Todos os procedimentos experimentais foram analisados e previamente aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Cbiotec/UFPB (CEUA), sob a certidão 1805/13.

3.1.2 Preparo da solução do alcaloideMHTP

O alcaloide MHTP foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Luis César Rodrigues, Departamento de Biotecnologia, Cbiotec/UFPB. A solução desse alcaloide foi preparada para administração da dose de 1000 mg/kg do MHTP em solução salina (9%) e Tween 20 a 2%, tanto para avaliação da toxicidade pre-clínica aguda como para avaliação da genotoxicidade.

3.2 Métodos

3.2.1 Avaliação da toxicidade pré clínica aguda

O teste de toxicidade pré-clínico agudo foi realizado conforme o *Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária* (ANVISA/2013). Este documento sugere como estudos não clínicos de segurança, dentre outros, o estudo de toxicidade de dose única (aguda). Machos e fêmeas (n=6) de camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*), foram tratados com 1000 mg/kg do MHTP via oral (v.o.) e aos grupos controles, machos e fêmeas (n=6), foi administrado, apenas o veículo empregado na dissolução do alcaloide, conforme descrito no item 3.1.2. e mantidos em observação por um período máximo de 14 dias. Os animais foram observados cuidadosamente para identificar número de mortes e sinais tóxicos de caráter geral nos intervalos: 0, 15, 30 e 60 minutos; 4 horas; 24 horas e diariamente durante 14 dias. Durante estes intervalos de tempo, analisou-se a ocorrência de alterações no SNC como: hiperatividade, irritabilidade, agressividade, tremores, convulsões, catatonia, analgesia, anestesia, resposta ao toque diminuído, ambulação, capacidade de limpeza, levantar, assim como alterações no SNA como: diarreia, constipação, defecação, micção, tônus muscular, entre outros. A observação desses parâmetros comportamentais foi realizada seguindo o protocolo descrito por Almeida e colaboradores (1999), demonstrada a seguir, na Tabela 1.

ATIVIDADE FARMACOLÓGICA	Quantificação dos efeitos (0) sem efeito, (-) efeito diminuído, (+) efeito aumentado, (++) efeito intenso				
	até 30'	1h	2h	3h	4h
1 – SNC					
a – Estimulante					
Hiperatividade					
Iritabilidade					
Agressividade					
Tremores					
Convulsões					
Piloereção					
Movimento intenso das vibrissas					
Outras					
b – Depressora					
Hipnose					
Ptose palpebral					
Sedação					
Anestesia					
Ataxia					
Reflexo do endireitamento					
Catatonía					
Analgesia					
Resposta ao toque diminuído					
Perda do reflexo corneal					
Perda do reflexo auricular					
c – Outros comportamentos					
Ambulação					
Bocejo excessivo					
Limpeza					
Levantar					
Escalar					
Vocalizar					
Sacudir a cabeça					
Contorções abdominais					
Abdução das patas do trem posterior					
Pedalar					
Estereotípia					
2 – SN AUTÔNOMO					
Diarréia					
Constipação					
Defecação					
Respiração forçada					
Lacrimejamento					
Micção					
Salivação					
Cianose					
Tono muscular					
Força para agarrar					
3 – MORTE					

Tabela 1: Tabela das Alterações do SNC (Almeida, 1999).

3.2.1.1 Avaliação da evolução ponderal e do consumo de água e ração

Para a avaliação de possíveis efeitos tóxicos após o tratamento com o MHTP os animais foram pesados diariamente, bem como, avaliados os consumos de água e ração. O ganho de peso para cada animal do grupo foi determinado, utilizando a seguinte fórmula: % de ganho de peso = [peso final (g) / peso inicial(g) -1] x100.

3.2.1.2 Avaliação dos índices de peso dos órgãos

Após a eutanásia dos animais por overdose de anestésico tiopental sódico (Thiopentax ®, Cristália - Produtos Químicos Farmacêuticos), os órgãos: timo, coração, baço, fígado e rins foram retirados e pesados. Os índices de peso dos órgãos foram calculados seguindo a fórmula: índice = peso do órgão (mg) / peso do animal (g).

3.2.1.3 Avaliação dos parâmetros bioquímicos e hematológicos

No décimo quarto dia, os animais, em jejum prévio de seis horas, foram anestesiados com tiopental sódico, 40 mg/kg (Thiopentax®, Cristália - Produtos Químicos Farmacêuticos) e o sangue, obtido do *sinus orbital* de cada camundongo, foi coletado com auxílio de uma pipeta *Pasteur* heparinizada, e em seguida, transferido para dois tubos do tipo Eppendorff. Uma alíquota de sangue foi destinada para avaliação de parâmetros hematológicos (eritrograma e leucograma) e outra foi centrifugada por 10 minutos a 3500 rpm, para obtenção do soro, destinado a análises bioquímicas: ureia, creatinina, ácido úrico, colesterol total, triglicérideo, proteínas totais, albumina, glicose e transaminases (aspartatoaminotransferase – AST e alanina aminotransferase-ALT) (PITA, 2010). Para as análises bioquímicas e hematológicas foram utilizados Kits específicos para o equipamento bioquímico automático Cobas Mira Plus® (Roche Diagnostic System) e para o equipamento

hematológico celular automático *Animal BloodCounter*(Vet), respectivamente. Os esfregaços sanguíneos foram corados manualmente com o corante panótico (RenyLab) e analisados em microscópio óptico, para confirmação e controle da contagem de células.

3.2.2 Avaliação da genotoxicidade do MHTP

Ensaio do micronúcleo em sangue periférico

Para o ensaio do micronúcleo em sangue periférico, grupos de seis camundongos Swiss fêmeas foram tratados por via oral (gavagem) com a dose de 1000 mg/kg. Um grupo tratado com a droga padrão (ciclofosfamida - 50 mg/kg – v.o.) e um grupo controle (solução salina e tween 20 à 2%) foram incluídos. Após 48 horas, os animais foram anestesiados com tiopental sódico (40 mg/kg - Thiopentax®, Cristália) e amostras de sangue periférico foram coletadas pelo *sinus orbital*, para confecção das extensões sanguíneas. Após secagem, as lâminas foram coradas com coloração panótica (Newprov®) para posterior análise em microscópio óptico. Para cada animal, três extensões sanguíneas foram preparadas e um mínimo de 2000 eritrócitos contados para determinação da frequência de eritrócitos micronucleados (HAYASHI, 2007).

3.2.3 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m.) e analisados empregando-se o test t *Student*. Foram considerados significativos quando $p < 0,05$. Os resultados foram analisados utilizando o programa *GraphPad Prism*® versão 5.0 (Graph Pad Software, San Diego, CA, U.S.A.).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação da toxicidade pré-clínica aguda do MHTP

4.1.1 Avaliação comportamental, evolução ponderal e consumo de água e ração

Após o tratamento agudo, via oral, com a dose de 1000 mg/kg em camundongos, não foi evidenciada morte, nem alterações comportamentais nos animais avaliados.

Na Tabela 2 estão expressos os valores referentes ao consumo de água e ração, avaliados durante os 14 dias de observação, bem como a evolução ponderal e porcentagem de ganho de peso dos animais. De acordo com os resultados obtidos, pode-se observar que não houve diferenças significantes no peso dos animais entre os grupos, nem no consumo de água e ração no grupo de fêmeas e machos tratados em relação aos seus respectivos controles.

Tabela 2: Consumo de água e ração, avaliação ponderal e porcentagem de ganho de peso dos animais dos diferentes grupos experimentais.

Machos					
Grupos	H2O (mL)	Ração (g)	Início (g)	Final (g)	Ganho de peso (%)
Controle	84,29 ± 35,83	42,01 ± 10,97	28,60 ± 3,08	38,05 ± 7,89	36,00 ± 19,92
MHTP	63,21 ± 56,49	32,72 ± 14,27	27,47 ± 1,10	39,00 ± 1,35	41,22 ± 5,19
Fêmeas					
Controle	47,14 ± 28,87	37,16 ± 10,17	30,56 ± 2,29	33,14 ± 5,17	19,88 ± 10,41
MHTP	49,64 ± 14,21	37,12 ± 6,53	26,17 ± 2,61	30,70 ± 3,53	17,44 ± 5,70

Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média após análise do teste t *Student*.

Parâmetros metabólicos, como o consumo de água e alimentos, e avaliação ponderal com a porcentagem do ganho de peso, devem ser analisados nos estudos pré-clínicos para investigação da toxicidade de uma amostra em estudo sobre o sistema gastrointestinal. O resultado demonstrou que a substância teste, o MHTP, não promoveu alteração no sistema gastrointestinal.

Após o tratamento oral agudo com a dose de 1000 mg/kg do alcaloide sintético MHTP, a maior dose a ser testada de uma substância pura ou isolada, segundo o guia 423/2001 da OEDC (*Organisation for EconomicCo-operationandDevelopment*), não foi evidenciada morte, o que caracteriza baixa toxicidade do MHTP e uma DL50 (Dose Letal para 50% dos animais) acima de 1000 mg/kg. De acordo com o *Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos da ANVISA* (2013), os estudos para a determinação da DL50 não são necessários e podem ser utilizados métodos alternativos para a sua estimativa envolvendo um menor número de animais, tais como os preconizados nos guias da OECD. Também não foram observadas alterações comportamentais nos camundongos machos e fêmeas avaliados. O valor acima de 1000 mg/kg da DL50 do MHTP confirma a sua baixa toxicidade aguda, indicando que o alcaloide sintético MHTP pode ser administrado com elevado grau de segurança.

4.1.2 Avaliação do índice de peso dos órgãos

Após a eutanásia dos animais, os órgãos foram removidos, pesados e analisados macroscopicamente. Não foram observados sinais de hemorragia nem necrose, para confirmação dessas observações é necessário a realização do estudo histopatológico. Nenhuma alteração significativa no índice de peso de coração, fígado, rins, baço e timo foi observada entre os grupos em estudo, quando comparados ao grupos controle (Tabela 3).

Tabela 3: Efeitos do MHTP sobre o índice de peso dos órgãos dos camundongos dos diferentes grupos experimentais.

Índice de peso dos órgãos					
Machos					
Grupos	Coração	Fígado	Rins	Baço	Timo
Controle	3,93 ± 0,20	61,27 ± 9,08	12,66 ± 2,98	5,59 ± 0,52	2,94 ± 0,83
MHTP	3,96 ± 0,41	55,44 ± 3,46	12,02 ± 1,63	5,58 ± 1,92	3,87 ± 0,95
Fêmeas					
Controle	4,13 ± 0,40	56,53 ± 4,80	11,09 ± 0,53	7,56 ± 1,31	3,32 ± 0,51
MHTP	4,26 ± 0,50	55,12 ± 7,48	10,42 ± 1,30	7,05 ± 1,31	3,10 ± 0,23

Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média após análise pelo teste t *Student*.

4.1.3 Avaliação dos parâmetros bioquímicos

A análise da possível toxicidade do MHTP incluiu a avaliação de alterações bioquímicas. Não houve mudança significativa nos parâmetros renais (ureia, creatinina e ácido úrico) e hepáticos (atividade enzimática das transaminases ALT e AST), proteínas totais, colesterol total, triglicerídeo, glicose. No entanto os níveis de albumina apresentaram um aumento significativo nos animais machos tratados com MHTP em relação aos animais controle.

O tratamento oral de MHTP (1000 mg/kg) nas fêmeas ocasionou um aumento significativo nos níveis das proteínas totais, triglicerídeos e do colesterol total; o aumento significativo da atividade enzimática da transaminase ALT indicou uma alteração nos parâmetros hepáticos, em relação aos animais controle (Tabela 4).

Tabela 4: Efeito do MHTP nos parâmetros bioquímicos de sangue periférico de camundongos.

Parâmetros Bioquímicos (Unidade)	Machos		Fêmeas	
	Controle	MHTP	Controle	MHTP
Glicose (mg/dL)	65,33 ± 33,08	103,8 ± 32,84	113,6 ± 22,65	92,67 ± 38,47
Ureia (mg/dL)	126,0 ± 137,0	33,67 ± 10,46	30,80 ± 9,52	27,17 ± 6,82
Creatinina (mg/dL)	0,63 ± 0,20	0,86 ± 0,38	0,61 ± 0,11	0,68 ± 0,19
Colesterol total (mg/dL)	65,00 ± 24,64	86,83 ± 11,69	39,80 ± 9,41	56,83 ± 9,86**
Triglicerídeos (mg/dL)	95,00 ± 18,08	99,83 ± 29,23	70,60 ± 9,47	103,2 ± 18,67**
Ácido úrico (mg/dL)	2,60 ± 0,96	2,59 ± 0,90	3,00 ± 1,80	1,75 ± 0,33
AST ^a (U/l)	130,3 ± 49,66	127,5 ± 50,87	127,2 ± 50,64	120,2 ± 45,23
ALT ^b (U/l)	6,66 ± 3,51	17,83 ± 10,11	15,20 ± 2,58	34,50 ± 13,62**
Proteínas totais (g/dL)	4,67 ± 0,55	5,25 ± 0,50	4,21 ± 0,73	5,15 ± 0,29**
Albumina (g/dL)	1,31 ± 0,37	1,73 ± 0,18*	1,58 ± 0,39	1,70 ± 0,18

Os dados estão apresentados como média ± erro padrão da média e foram submetidos à análise pelo teste t *Student*. Os asteriscos indicam a significância após análise do teste t. * p < 0,05; ** p < 0,01 quando comparados aos respectivos grupos controle.

a = Aspartatoaminotransferase;

b = Alanina aminotransferase.

Inúmeras enzimas ativas são encontradas dentro das células. Isso acontece devido ao equilíbrio entre a síntese e a degradação das mesmas; todavia, das muitas enzimas existentes, há pequenas quantidades que conseguem chegar ao espaço extracelular em condições fisiológicas. Em muitas doenças, a atividade de várias enzimas aumenta no espaço extracelular. Sua migração se dá devido à permeabilidade aumentada das membranas ou pela destruição das estruturas celulares, alterando a atividade das mesmas na corrente sanguínea. As determinações das atividades enzimáticas no soro são de grande importância no auxílio do diagnóstico de enfermidades e monitoramento de lesões de órgãos e tecidos afetados (PEREIRA, 2008).

Os hepatócitos são células metabolicamente complexas que contêm concentrações elevadas de diversas enzimas. As principais atividades enzimáticas dosadas no soro para determinar a gravidade da lesão hepática são aspartatoaminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), gama glutamiltransferase (GAMA – GT) e lactato desidrogenase (LD) que estão distribuídas intracelularmente em localizações específicas (HENRY, 2008).

As transaminases são enzimas que catalisam a interconversão de aminoácidos e alfa-ceto-ácidos por transferência do grupo amino. Estão amplamente distribuídas nos tecidos, predominando AST, no fígado, coração, músculo cardíaco, músculo estriado, rim e pâncreas, e ALT no fígado, rim e coração. A AST está presente no citosol e na mitocôndria dos hepatócitos. A enzima ALT é citosólica. As atividades plasmáticas destas enzimas são controladas por um mecanismo de liberação enzimática localizada na membrana do hepatócito. A velocidade de excreção das transaminases é variável, a ALT elimina-se mais rapidamente do que a AST (MILLER, 1999).

Para avaliar a função hepática, as concentrações séricas de AST e ALT foram avaliadas, pois esses são considerados marcadores da função e alteração hepática. Embora essas enzimas não sejam específicas dos hepatócitos e poderem estar aumentadas em lesões de outros órgãos, as hepatopatias são as causas mais comuns de elevações séricas dessas duas enzimas (HENRY, 2008). Foi observada uma alteração da atividade enzimática da transaminase ALT no grupo das fêmeas tratadas oralmente com o alcaloide MHTP na dose de 1000 mg/kg, indicando um possível dano hepatocelular leve, uma vez que a ALT é encontrada no citosol celular e liberada primeiro que a AST, sendo esta aumentada nas lesões graves e crônicas

hepáticas. Entretanto, nesse caso, deve-se considerar a alta dose administrada (1000 mg/kg), que é 400 e 200 vezes maior, que as doses, com efeito, anti inflamatório diante do modelo experimental de peritonite, sendo 2,5 e 5 mg/kg respectivamente (CORDEIRO, 2012).

Para avaliar a função renal, alguns compostos nitrogenados não proteicos (NPN) foram avaliados: ureia, creatinina e ácido úrico. Esses compostos são formados no organismo como resultados do catabolismo de ácidos nucleicos, aminoácidos e proteínas. Concentrações elevadas dos principais componentes dos NPN ocorrem como consequência da função renal diminuída (CHANDRAMOHAN, 2009).

O ácido úrico é o principal produto do catabolismo das purinas, sendo formado no fígado. A concentração do ácido úrico nos fluidos corporais é determinada pela relação entre os índices de produção e eliminação do mesmo. Uma das causas de hiperuricemia é o defeito na eliminação onde se observa hiperuricemia sem uricúria associada com elevação da ureia no sangue, como ocorre na insuficiência renal, inibição farmacológica da função renal, entre outros (PEREIRA, 2008).

A ureia é um produto da degradação do metabolismo dos aminoácidos, produzida a partir da amônia no ciclo da ureia hepática. A ureia é filtrada pelos glomérulos e reabsorvida nos dutos coletores juntamente com a água (GROSS, 1996). A produção de ureia é afetada pela ingestão de proteína e pela taxa de síntese; a nutrição deficiente leva a valores plasmáticos reduzidos de ureia, enquanto os estados catabólicos (queimaduras) e cargas elevadas de proteína causam aumento da mesma.

Uma vez que a ureia é sintetizada no fígado, a hepatopatia avançada, frequentemente, esta associada com ureia plasmática reduzida (LUM, 1989). Como os resultados obtidos nesse estudo não mostraram alterações significantes nos níveis plasmáticos de ureia entre os grupos de animais tratados com o MHTP, sugere-se o não comprometimento hepático e, portanto, corroborando com os níveis séricos de AST em ambos os sexos e ALT e nos machos, uma vez que as fêmeas tratadas com MHTP apresentaram uma elevação no nível sérico de ALT, podendo ter levado a uma alteração sem comprometimento hepático, uma vez que a altos níveis séricos de enzimas citoplasmáticas, como a ALT, devido ao aumento da permeabilidade da membrana citoplasmática, caracteriza uma lesão hepática leve.

Também não foi observada, nesse estudo, alteração significativa do ácido úrico sérico, indicando que a função renal também não está comprometida, bem como, a função hepática está normal para os machos que receberam MHTP e nas fêmeas a ALT foi alterada.

No músculo, a creatina é convertida em fosfocreatina, que serve como uma fonte rica de energia. Fisiologicamente, a creatina perde água espontaneamente, formando sua amida cíclica (creatinina). Uma vez formada, a creatinina não é reutilizada no metabolismo corporal e, assim, funciona exclusivamente como um produto de degradação (HENRY, 2008). A taxa de produção da creatinina está relacionada à massa muscular, à atividade muscular e à ingestão de creatina na carne, bem como à ingestão total de proteínas; quão elevadas essas variáveis, maior a concentração sérica de creatinina e enquanto reduções nessas variáveis diminuem o valor sérico de creatinina (RAHN, 1999). A creatinina é excretada na circulação em taxa, relativamente, constante. Uma fração substancial da excreção da creatinina nos rins é o resultado da secreção tubular proximal.

A creatinina também é filtrada livremente pelos glomérulos, mas não é reabsorvida. Portanto a creatinina sérica elevada está associada com uma redução na taxa de filtração glomerular (HENRY, 2008). Existe uma variação diária relativamente pequena da creatinina em um indivíduo saudável, com variação média de, aproximadamente, 5% (KEEVIL, 1998). Portanto, pequenas variações nos limiares da creatinina em uma pessoa servem como marcadores sensíveis de alterações na função renal se outras causas de alteração da creatinina puderem ser eliminadas (HENRY, 2008). Como os resultados obtidos neste trabalho não mostraram alterações significantes nos níveis plasmáticos de creatinina entre os grupos de animais tratados com MHTP, sugere-se o não comprometimento renal, corroborando com os níveis séricos de ácido úrico acima discutido.

As determinações das concentrações do colesterol total e triglicerídeo, entre outros lipídios plasmáticos, são importantes nas hiperlipidemias que consistem no principal fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (PEREIRA, 2008). Foram observadas mudanças significativas nas dosagens de colesterol total e triglicerídeos, sugerindo que o tratamento com altas doses de MHTP pode oferecer riscos para o desenvolvimento de dislipidemias.

Os níveis de glicose, proteínas totais e albumina foram dosados para avaliar o perfil bioquímico geral dos animais tratados com o MHTP e determinar a presença de alterações metabólicas.

Alem de fazer parte dos constituintes estruturais fundamentais das células, as proteínas participam praticamente de todos os processos corporais, sendo a Albumina a principal proteína do plasma (50 a 60% das proteínas totais).

A hiperproteinemia pode ser causada por hemoconcentração (vômitos, diarreia, queimaduras,) e no diabetes, quando a albumina está normal; deve-se realizar a determinação do hematócrito para confirmação ou descarte da hemoconcentração. O aumento das proteínas totais com um coeficiente de A/G (Albumina/Globulinas) normal e sem hemoconcentração ocorre apenas devido a um erro técnico. O aumento no nível sérico de Albumina pode ocasionar hiperproteinemia essencial, está presente nos processos infecciosos e parasitários agudos e crônicos, sendo um diagnostico impreciso (PEREIRA, 2008). Os valores séricos das proteínas totais foram aumentados nas fêmeas tratadas com MHTP, no entanto o nível de albumina permaneceu normal e o nível de albumina foi aumentado nos machos tratados com o alcaloide MHTP na dose de 1000 mg/kg, permanecendo normal o índice sérico das proteínas totais. Todavia, deve-se repetir esses testes, uma vez que nos machos apenas o nível da albumina aumentou, a correlação com as proteínas totais permaneceu normal. Nas fêmeas o nível sérico de albumina permaneceu normal e o de proteínas totais alterado, indicando uma hemoconcentração, que foi avaliada pela determinação do hematócrito, esta sendo negativa, como mostra a Tabela 4.

Tais resultados podem estar associados à susceptibilidade e sensibilidade diferenciadas aos fármacos entre os gêneros (ANDERSON, 2008), entretanto estudos mais detalhados de toxicidade aguda e de doses repetidas devem ser realizados para confirmar tal hipótese.

4.1.4 Avaliação dos parâmetros hematológicos

A análise toxicológica do efeito do MHTP incluiu ainda a avaliação de alterações hematológicas. Em relação à avaliação hematológica, não houve alterações significativas nos parâmetros Volume Corpuscular Médio (VCM), Concentração Hemoglobínica Corpuscular Média (CHCM) e Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) entre os grupos tratados e controles. Também não foram observadas mudanças significativas nos parâmetros do eritrograma (número total de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito) e leucograma (número total de leucócitos e sua contagem diferencial) (Tabela 5). A hemoconcentração avaliada pelo índice de hematócrito foi descartada.

Tabela 5: Efeito do MHTP nos parâmetros hematológico de sangue periférico de camundongos.

Parâmetros Hematológicos (Unidade)	Machos		Fêmeas	
	Controle	MHTP	Controle	MHTP
Hemácias(106/mm3)	9,28 ±1,91	9,03±0,95	8,15±0,71	8,58±0,48
Hemoglobina(g/dL)	13,77 ±2,08	12,87±3,10	12,82±1,00	13,77±0,50
Hematócrito(%)	43,30 ±6,91	45,35±6,38	39,56±3,84	42,23±1,85
VCM ^a (fm3)	47,00 ±2,36	50,17±2,48	48,40±0,89	49,17±1,47
HCM ^b (pg)	14,98 ±1,06	14,60±4,14	15,78±0,31	16,08±0,65
CHCM ^c (g/dL)	31,85 ±0,85	29,37±8,65	32,52±1,03	32,62±0,56
Leucócitos (103/mm3)	3,73±0,79	2,40±1,69	4,15±2,08	4,40±3,32
Neutrófilos (%)	35,67±16,84	16,67±7,68	18,40±10,50	23,50±13,84
Eosinófilos (%)	-	-	0,20±0,44	0,16±0,40
Linfócitos (%)	58,67±14,90	78,50±9,71	74,60±11,04	72,33±14,00
Monócitos (%)	5,66±4,4	4,83±2,48	6,80±3,11	4,00±3,16

Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média após análise pelo teste t *Student*..

a = Volume Corpuscular Médio;

b = Hemoglobina Corpuscular Média;

c = Concentração Hemoglobínica Corpuscular Média.

O sistema hematopoiético é um dos alvos mais sensíveis a compostos tóxicos e um importante índice de estado patológico no animal (HARPER, 1973; MUKINDA, 2007). Neste estudo, os parâmetros hematológicos analisados permaneceram inalterados quando comparados ao grupo controle sugerindo que o MHTP na dose avaliada, não exerce efeitos sobre as células hematopoiéticas.

4.2 Avaliação da genotoxicidade

4.2.1 Avaliação da frequência de eritrócitos micronucleados em sangue periférico

Para avaliar o possível efeito mutagênico *in vivo* do MHTP foi realizado o ensaio do micronúcleo em sangue periférico, cujo resultado está apresentado na Tabela 6. O tratamento dos animais com a dose de 1000 mg/kg não induziu aumento na frequência de eritrócitos micronucleados no sangue periférico quando comparado ao grupo controle (Tween-20, 2%). Esses resultados sugerem que o alcaloide sintético MHTP não apresentou efeito mutagênico no modelo experimental avaliado (Tabela 6).

Tabela 6: Frequência de eritrócitos micronucleados em sangue periférico de camundongos.

Fêmeas		
Grupos	Dose (mg/kg)	Células micronucleadas
Controle	-	3,80 ± 0,37
Ciclofosfamida	50 mg/kg	18,20 ± 1,56*
MHTP	1000 mg/kg	5,00 ± 0,71

Os dados estão apresentados como média ± erro padrão da média e foram submetidos à análise pelo teste t *Student*. *p < 0,05; quando comparados ao grupo controle.

CONCLUSÃO

5 CONCLUSÕES

Frente aos resultados obtidos nesse estudo, pode-se concluir que o alcaloide sintético MHTP [1 - (3 - metoxi - 4 - hidroxifenil) - 7 - metoxi - 1, 2, 3, 4, - tetrahydroisoquinolina] possui baixa toxicidade aguda *in vivo*, após administração oral de 1.000 mg/kg.

Além disso, não apresentou atividade genotóxica *in vivo* no ensaio de micronúcleo em sangue periférico, quando foi administrado uma dose oral de 1.000 mg/kg.

Portanto, pode-se afirmar que o alcaloide sintético MHTP possui baixa toxicidade na dose avaliada nos modelos experimentais utilizados, fornecendo subsídios importantes relacionados à sua segurança para realização de estudos farmacológicos posteriores.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, R. N., *et al.*; Metodologia para avaliação de plantas com atividade no Sistema Nervoso Central e alguns dados experimentais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.80, p.72-76, 1999.

ALMEIDA, R. N. **Psicofarmacologia: fundamentos práticos**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p.357, 2006.

ANDERSON, G. D. Gender differences in pharmacological response. **International review of neurobiology**, v.83, p. 1-10, 2008.

AWUAH E., *et al.*; Strategies and Synthetic Methods Directed Toward the Preparation of Libraries of Substituted Isoquinolines. **The Journal of Organic Chemistry**, v.75, p. 5627-5634, 2010.

BHADRA, K., *et al.*; Therapeutic potential of nucleic acid-binding isoquinoline alkaloids: Binding aspects and implications for drug design. **Medicinal Research Reviews**, v.31, p. 821-862, 2011.

BONASSI, S., *et al.*; An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. **Carcinogenesis**. v.28(3), p.625-631, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Gerência de Avaliação de Segurança e Eficácia – GESEF. **Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos**. 2ª versão. 31 de janeiro de 2013e.

CARVALHO, M. B., *et al.*; Correlação entre a evolução clínica e a frequência de micronúcleos em células de pacientes portadores de carcinomas orais e da orofaringe. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.48(8), p.317-322, 2002.

CHAEA, H.-J., *et al.*; Heme oxygenase-1 induction by (S)-enantiomer of YS-51 (YS-51S), a synthetic isoquinoline alkaloid, inhibits nitric oxide production and nuclear factor- κ B translocation in ROS 17/2.8 cells activated with inflammatory stimulants. **International Immunopharmacology**, v. 12, p.1559-1568, 2007.

CHANDRAMOHAN, G., *et al.*; "Effect of 3-hydroxy methyl xylitol on hepatic and renal function almarkers and protein levels in streptozotocin diabetic rats." **African Journal of Biochemistry Research**, v. 3, p. 198–04, 2009.

CLARDY J., *et al.*; Lessons from natural molecules. **Nature**, v.432, p.829–837, 2004.

CORDEIRO, M. B. Aplicação da reação de Pictet-Spengler na síntese de alcaloides fenil tetra hidroisoquinolínicos inéditos. Dissertação de Mestrado. Centro de Ciências da Saúde. **Universidade Federal da Paraíba**. João Pessoa- PB, 2012.

COSTA E SILVA, A., *et al.*; Avaliação da frequência de micronúcleos em eritrócitos periféricos de mandi-amarelo (*Pimelodus maculatus*) do rio Paranaíba. **Revista do Núcleo Interdisciplinar de Pesquisa e Extensão do UNIPAM**, v.1, p.167-179, 2010.

DE OLIVEIRA AZEVEDO, M., *et al.*; Técnicas básicas em biologia molecular. **Brasília: Editora Universidade de Brasília**. ISBN 8523006850. 2003.

DONG, H., *et al.*; Cardiovascular effects of substituted tetrahydroisoquinolines in rats. **British Journal of Pharmacology**, v.107, p.262-268, 1992.

GISELE DE CAMPOS PINTO. Síntese de alcaloides de interesse farmacológico. Dissertação de Mestrado. **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**; Instituto de Química. Porto Alegre, julho de 2011.

GROSS, P., *et al.*; Hyponatremia: Patophysiology, differential diagnosis and news aspect of treatment. **Clinical Nephrology**, v.46, p.273-276, 1996.

GRUNDON, M.F. The Alkaloids. **Royal Society of Chemistry**, v.6, p.1-53, 1976.

Guia para a condução de Estudos não clínicos de Segurança necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos. **www.anvisa.gov.br**, Brasília, 01 de março de 2010.

RAHN, K. H., *et al.*; How to assess glomerular fuction and damage in humam.**Journal of Hypertension**, v.17, p.309-317, 1999.

HARPER, H. A. Review of Physiological Chemistry.**Lange Medical Publications**, Los Altos, California, USA, v.14, 1973.

HAYASHI, M, *et al.*; *In vivo* erythrocyte micronucleus assay III. Validation and regulatory acceptance of automated scoring and the use of rat peripheral blood reticulocytes, with discussion of non-hematopoietic target cells and a single dose-level limit test.**MutationResearch**, v. 627, p.10-30, 2007.

HENRY, J. B. **Diagnósticos clínicos e tratamentos por métodos laboratoriais**. 20 ed. Barueri, SP: Manole, 2008.

IWAO OJIMA. MiniperspectiVes: Natural Products in Drug DisoVery Modern Natural Products Chemistry and Drug Discovery; Department of Chemistry and Institute of Chemical Biology & Drug DiscoVery; **State UniVersity of New York at Stony Brook**, New York 11794-3400. ReceiVed October, v. 14, 2007.

IWAO OJIMA. Modern Natural Products Chemistry and Drug Discovery.**Journal of Medicinal Chemistry**, v.51; p.2587–2588,2008.

KEEVIL B.G., *et al.*; Biological variation of cystantin C: implications for the assessment of glomerular filtration rate. **ClinicalChemistry**, v.44, p.15-35, 1998.

LAPA, A.J., *et al.*; Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: SIMÕES, C.M.O.; SHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO; J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R.; (org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, p.247-262, 2003.

LARINI, L. Avaliação toxicológica. In: LARINI, L. **Toxicologia**. São Paulo: Editora Manole, 1999.

LI, H. B., *et al.*; Effects and mechanism of berberine on the hypertensive renal injury rats induced by enriched high fat-salt-fructose diet. **Journal of Chinese medicinal materials**, v.34 ,p.412-415, 2001.

LUO, Y., *et al.*; Norisoboldine Inhibits the Production of Pro-inflammatory Cytokines in Lipopolysaccharide-Stimulated RAW 264.7 Cells by Down-Regulating the Activation of MAPKs but Not NF- κ B. **Inflammation**, v.33, p.389-397, 2010.

LUM, G., *et al.*; Significance of low serum urea nitrogen concentrations. **Clinical Chemistry**, v.35, p.1630-40, 1989.

MATEUCA, R., *et al.*; Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. **Biochimie**, v.88, p.515-531, 2006.

Miller O. **Laboratório para o clínico**. 8ª edição. São Paulo: Editora Arheneu, p.607, 1999.

MOUHSENLAHLOU. The Success of Natural Products in Drug Discovery. **Pharmacology & Pharmacy**, v.4, p.17-31, 2013.

MUKINDA, J. T., *et al.*; Acute and chronic toxicity of the aqueous extract of *Artemisia afra* in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v.112 (1), p. 138-144, 2007.

PEREIRA, J.V. **Bioquímica Clínica**. 2ed. João Pessoa-PB. Editora Universitária, 2008.

PITA, J. C. L. R. Avaliação da atividade antitumoral e toxicidade do *Trachyloban-360* de *Xylopia langsdorffiana* St. Hil. & Tul. (Annonaceae). Dissertação de Mestrado Centro de Ciências da Saúde, **Universidade Federal da Paraíba**. João Pessoa-PB. 2010.

RATES, S. M. K. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino de Farmacognosia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.11, p. 57-69, 2001.

REZENDE, O. S. J.; PALHAES, L. B.; CUNHA, L. C. Intoxicações por plantas tóxicas notificadas no CIT - Centro de Informação Toxicológica de Goiás no período de 2001 a 2005. Goiânia: **Universidade Federal de Goiás**. v.72, 2006.

ROBERTS M. F., *et al.*; Alkaloids: Biochemistry, Ecology, and Medicinal Applications. **Plenum Press**, New York, 1998.

SALVADORI, D.M.F., *et al.*; Teste do micronúcleo em células humanas *in vitro*. In: RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. Mutagênese Ambiental. **Canoas: ULBRA**, v.8, p.201-223. 2003.

SHAMMA, M. The Isoquinoline Alkaloids: Chemistry and Pharmacology. **Academic Press**, 1972.

SILVA, D. F., *et al.*; Endothelium-derived nitric oxide is involved in the hypotensive and vasorelaxant effects induced by discretamine in rats. **Pharmazie**, v.64, p.327-331, 2009.

VALADARES, M. C. Avaliação de toxicidade aguda: estratégias após a “era do teste dl50”. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.3(2), p.93-98, 2006.

WILLIAM CHARLES EVANS E DAPHNE EVANS. **Treaseand Evans Pharmacognosy**. Sixteenth edition. Elsevier Limited. All rights reserved. ISBN 978-0-7020-2933-2. International Edition, ISBN 978-0-7020-2934-9, 2009.